

1/5/1 (Item 1 from file: 351)  
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

013531953

WPI Acc No: 2001-016159/200102

XRAM Acc No: C01-004493

New treatment for a patient suffering from a brain or spinal cord injury

or neurodegenerative disease using cultured bone marrow cells

Patent Assignee: FORD HEALTH SYSTEM HENRY (FORD-N)

Inventor: CHOPP M; LI Y

Number of Countries: 091 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200069448	A1	20001123	WO 2000US12875	A	20000511	200102
B						
AU 200051300	A	20001205	AU 200051300	A	20000511	200113
EP 1183035	A1	20020306	EP 2000935910	A	20000511	200224
			WO 2000US12875	A	20000511	
JP 2002544234	W	20021224	JP 2000617907	A	20000511	200313
			WO 2000US12875	A	20000511	
AU 780994	B2	20050428	AU 200051300	A	20000511	200533
US 20050169896	A1	20050804	US 99134344	P	19990514	200552
			WO 2000US12875	A	20000511	
			US 2002980614	A	20020417	
			US 200427881	A	20041230	

Priority Applications (No Type Date): US 99134344 P 19990514

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 200069448	A1	E	43 A61K-035/00	

Designated States (National): AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY

CA CH CN

CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP

KE KG KP

KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO

RU SD SE

SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB

GH GM GR

IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

AU 200051300 A A61K-035/00 Based on patent WO 200069448

EP 1183035 A1 E A61K-035/00 Based on patent WO 200069448

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB

GR IE IT

LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

JP 2002544234 W 36 A61K-035/28 Based on patent WO 200069448

AU 780994 B2 A61K-035/00 Previous Publ. patent AU

200051300

Based on patent WO 200069448

US 20050169896 A1 A61K-045/00 Provisional application US 99134344

CIP of application WO

2000US12875

2002980614

Abstract (Basic): WO 200069448 A1

NOVELTY - Treating a patient suffering from a brain or spinal cord

injury or neurodegenerative disease, comprising intravascular administration or transplantation of cultured bone marrow cells into

the brain or spinal cord and generating neurons in the brain, is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) activating the differentiation of neural cells in an injured

brain or spinal cord comprising transplanting bone marrow cells

adjacent to the injured brain cells, and activating the endogenous

central nervous system stem cells to differentiate into neurons;

(2) treating injured brain or spinal cord cells, comprising

transplanting cultured bone marrow cells near the injured brain cells,

and generating new neurons at the location of transplantation or of

intravascular injection of the cells; and

(3) transplanting injured brain or spinal cord by injecting or

transplanting a composite of mesenchymal stem cells (MSC) and neurospheres.

ACTIVITY - Neuroprotective; nootropic; cerebroprotective.

Rats were subjected to middle cerebral artery occlusion for 2 hours

using the intraluminal occlusion model. Experimental groups included

MCAo alone without mesenchymal stem cells (MSC) transplantation, and

injection of phosphate buffered saline, non-nerve growth factor (NGF)

cultured bone marrow MSCs and NGF cultured MSCs, respectively into the

ischemic boundary zone at 24 hours after MCAo. Significant recovery of

somatosensory behavior was detected in animals transplanted with MSCs

compared with MCAo alone animals. Animals that received MSCs cultured

with NGF displayed significant recovery in motor, somatosensory and

neurological severity score (NSS) behavioral tests at 2 weeks post-transplantation with NGF, compared with transplantation of MSCs alone.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - For treating brain or spinal cord injuries and neurodegenerative diseases, and for activating the differentiation of neural cells in an injured brain or spinal cord (claimed).

pp; 43 DwgNo 0/11

Title Terms: NEW; TREAT; PATIENT; SUFFER; BRAIN; SPINE; CORD; INJURY;

DISEASE; CULTURE; BONE; MARROW; CELL

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-035/00; A61K-035/28; A61K-045/00

International Patent Class (Additional): A61P-025/28

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-544234

(P2002-544234A)

(43)公表日 平成14年12月24日 (2002.12.24)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 61 K 35/28  
A 61 P 25/28

識別記号

F I

A 61 K 35/28  
A 61 P 25/28

テマコード<sup>\*</sup> (参考)

4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21)出願番号 特願2000-617907(P2000-617907)  
(86) (22)出願日 平成12年5月11日(2000.5.11)  
(85)翻訳文提出日 平成13年11月13日(2001.11.13)  
(86)国際出願番号 PCT/US00/12875  
(87)国際公開番号 WO00/69448  
(87)国際公開日 平成12年11月23日(2000.11.23)  
(31)優先権主張番号 60/134,344  
(32)優先日 平成11年5月14日(1999.5.14)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ヘンリー フォード ヘルス システム  
アメリカ合衆国 40202 ミシガン州、デ  
トロイト、4ビー、フォード ブレース  
1

(72)発明者 リ、イ  
アメリカ合衆国 ミシガン 48187, カ  
ントン、ピツフォード ドライブ  
7046

(72)発明者 チョップ、マイケル  
アメリカ合衆国 ミシガン 48034, サ  
ウスフィールド、ブルックス レーン  
28415

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 発作の処置のための骨髄移植

(57)【要約】

神経変性疾患または神經損傷に罹患している患者を処置する方法を提供し、この方法は、必要とされる患者の脊髄または脳へ培養した骨髄細胞を移植する工程または骨髄細胞を脈管内注射する工程を包含する。損傷した脳においてニューロン細胞の分化を活性化する方法もまた提供し、この方法は、骨髄細胞を損傷した脳細胞に隣接させて移植する工程および内因性中枢神経系の幹細胞を活性化して、ニューロンに分化させる工程を包含する。損傷した脳細胞または脊髄細胞を処置する方法もまた提供し、この方法は、骨髄細胞を損傷した脳細胞の近辺に移植する工程および移植した位置で新しいニューロンを発生させる工程を包含する。MSCおよびニューロスフェアの複合体を用いて、損傷した脳または脊髄を処置する方法もまた提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脳または脊髄の損傷あるいは神経変性疾患に罹患している患者を処置する方法であって、以下の工程：

必要とされる該患者の脳または脊髄へ、培養した骨髄細胞を脈管内投与する工程または移植する工程；および

該患者の脳において新しいニューロンを発生させる工程を包含する、方法。

【請求項2】 損傷した脳または脊髄においてニューロン細胞の分化を活性化する方法であって、以下の工程：

骨髄細胞を該損傷した脳細胞に隣接させて移植する工程；および

内因性中枢神経系の幹細胞を活性化して、ニューロンに分化させる工程を包含する、方法。

【請求項3】 損傷した脳細胞または脊髄細胞を処置する方法であって、以下の工程：

培養した骨髄細胞を該損傷した脳細胞の近辺に移植する工程；および

培養した骨髄細胞の移植または脈管内（動脈内、静脈内）注射の位置で、新しいニューロンを発生させる工程を包含する、方法。

【請求項4】 MSCおよびニューロスフェアの複合体を注射または移植することによって、損傷した脳または脊髄を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、1999年5月14日に出願された、米国仮特許出願番号60/134,344（本明細書中で参考として援用される）の転換である。

【0002】

(技術分野)

本発明は、神経障害および神経変性疾患の処置に関する。より詳細には、本発明は、神経障害（発作、外傷性脳損傷、脊髄損傷）および神経変性（例えば、パーキンソン病）の処置のための、骨髄細胞および混合された骨髄細胞およびニューロスフェア（neurosphere）の使用に関する。

【0003】

(背景技術)

胚性組織由来のドナー細胞の脳内移植は、神経発生を促進し得る（Syndellら、1997）。線条体内的胎児の移植片が使用され、損傷を受けた脳幹神経節回路を再構築し、そして虚血の動物モデルにおける行動欠陥を改善した（Gotoら、1997）。成体生物に移植される胎児造血系幹細胞（HSC）または胚に移植される成体HSCは、細胞が播種された微小環境内で、内因性細胞を反映するキメラを生じる（Geigerら、1998）。多能性幹細胞は、成体CNSに保有され、そして成体脳は、新しいニューロンを形成し得る（Gage 1998；KempermannおよびGage、1998）。

【0004】

骨髄移植の概念は、他者により研究されている。例えば、Azzizziらの参考文献において、研究者は、ヒト骨髓間質細胞を、アルビノのラットの脳に移植する。これらの第一の観察は、ヒト間葉細胞がラットの星状細胞と類似の様式で移植され、移動し、そして生存し得ることであった。さらに、EgliitisおよびMezeyによる文書において、骨髄細胞は、成体マウスの脳に移植される場合、小膠細胞および大膠細胞に分化し得ることが示される。再び、これが、正常マウスの脳に移植される場合、生じた。これらの2つの論文が、いくつかの大

グリア細胞は骨髄の正常な成分である前駆体細胞から生じるという仮説を支持するため、使用された。しかし、骨髄細胞がニューロンに分化することを示す研究は存在しなかった。さらに、これが損傷した脳または脊髄および神経変性疾患において生じることの研究も存在しなかった。さらに、神経損傷（発作、外傷性脳損傷、脊髄損傷）および神経変性疾患（パーキンソン病）の、骨髄細胞を用いた処置が、機能的な結果を改善するというデータも存在しなかった。

#### 【0005】

##### （発明の要旨）

本発明に従って、中枢神経系の損傷および神経変性疾患に罹患した患者の処置（骨髄細胞を培養する工程ならびに必要な患者の脳に骨髄細胞を移植するかまたは投与し、そしてその患者の脳に新しいニューロンを産生するための工程を含む）が提供される。さらに、本発明者らは、CNS損傷および神経変性の処置のための骨髄細胞および胚性脳組織の複合体を使用する。また、損傷した脳における神経細胞の分化を活性化する方法（損傷した脳細胞に隣接して骨髄細胞を移植する工程、骨髄細胞の脈管内（動脈内、静脈内）投与およびニューロンに分化する内因性中枢神経系幹細胞を活性化する工程を含む）が提供される。損傷した脳および変性脳を処置する方法がまた、提供される（骨髄細胞を調製する工程ならびに損傷した脳細胞の近くに骨髄細胞を移植する方法および骨髄細胞の脈管内投与のための方法を含む）。

#### 【0006】

骨髄全体および骨髄の細胞成分が使用され（すなわち、間葉幹細胞、MSC；造血系幹細胞、HSG）、発作（ラット、マウス）および外傷性脳損傷（ラット）を処置した。骨髄の細胞成分は、特別な培地中および神経栄養物（neurotrophin）（NGF、BDNF）を含む培地中で培養された。細胞は、脳にか、内頸動脈にか、または大腿静脈のいずれかに直接注射された。結果の測定は、骨髄細胞の表現型形質転換を形態学的に同定するための2重染色免疫組織化学、ならびに神経学的欠陥を同定するための行動（behavioral）試験および機能性試験であった。本発明者らのデータは、発作、脊髄損傷、または外傷性脳損傷の、骨髄全体または細胞性成分を用いた処置が、有意に機能性欠陥を

低減することを示す。骨髄細胞はまた、実質細胞（parenchymal cell）の表現型を発現する。さらに、パーキンソン病の症状を誘導する神経毒MPTPを用いて処置されたマウスが、大脳内に送達される骨髄細胞を用いて処置された。パーキンソン病の症状は、骨髄細胞を用いて処置されたマウスにおいて有意に低減された。これらのデータは、骨髄細胞が、神経障害および神経変性疾患を処置するのに使用され得ることを示す。

#### 【0007】

この分野への主要な貢献および新規な貢献は、神経栄養物中における骨髄細胞の培養、発作、外傷およびパーキンソン病の、骨髄を用いた治療および処置のための、（増殖因子があるかまたはないかで培養された）これらの細胞の実質内（intraparenchymal）投与および脈管内投与である。

#### 【0008】

また、胎児ニューロスフェア由来の神経幹細胞、成体骨髄細胞由来の間葉幹細胞および成体Wistarラット由来の脳脊髄液からなる凝集物（NMCスフェア（NMC sphere）と呼ばれる）が開発される。これらのNMCスフェアは、発作および脳の外傷を処置するために首尾良く使用されて、そして神経変性疾患を処置するために使用され得る。

#### 【0009】

##### （詳細な説明）

一般に、本発明は、骨髄移植を用いて神経損傷および神経変性を処置する方法を提供する。骨髄細胞は、ニューロンおよび他の実質細胞に分化することが決定された。傷つけられた脳および脊髄内の骨髄細胞は、サイトカインおよび増殖因子のアレイを产生する。骨髄細胞は、増殖し、そして実質細胞（ニューロンを含む）に分化するために、脳における内因性幹細胞、上衣細胞を活性化する。次いで、新しいニューロンは、歯状回および嗅球において、ならびに損傷部位に隣接して存在する。従って、骨髄は、内因性中枢神経系幹細胞を活性化し、ニューロンに分化する。骨髄細胞はまた、脳の修復および形成性を促進する因子（サイトカインおよび増殖因子）を产生する。

#### 【0010】

本発明の方法は、骨髄細胞の特定の培養、および骨髄細胞の注射の特定の部位を使用する。細胞は、病変に隣接して、そして病変内ではない、周辺組織中に移植される。病変に隣接した組織は、骨髄細胞の生存および分化のために、発生中の脳の受容環境と類似した受容環境を提供する。骨髄が、特定の脳または脊髄損傷を起こしている神経損傷および神経変性において有用であり得るのは、この活性に基づく。さらに、骨髄細胞は、これらの細胞が脈管内に（すなわち、動脈内にかまたは静脈内に）投与される場合、神経損傷および変性を処置するのに有効である。従って、このような脳損傷後、脳組織が死ぬ場合、失われた組織を代償するために、骨髄およびその誘導体の移植が、細胞の十分な供給源および活性を提供し、このような損傷に対する脳の代償性応答を促進する。

#### 【0011】

骨髄は、ラットおよびマウスの虚血性脳、傷つけられたラット脳、傷つけられた脊髄の中におよびパーキンソンマウスの脳の中に移植される。脳への移植がまた、増殖因子（BDNF、NAF）の同時移植により実施された。骨髄（特にMSC）が、神経増殖因子（NGF）と共に培養された。

#### 【0012】

移植は、ラットおよびマウスの両方において実験的発作後に種々の時点（マウスにおいて、発作後4時間～2日、外傷後1日～7日、脊髄損傷後7日、およびパーキンソン病の発症後14日）で実施された。このデータは、虚血性脳への骨髄または成分の移植が、脳実質細胞（ニューロンを含む）への骨髄細胞の分化を生じることを示す。さらに、内因性脳幹細胞は、増殖し、そして実質細胞へ分化するために活性化される。これらの細胞は、脳内の異なる領域（海馬、嗅球および皮質を含む）に移動する。増殖因子と共にかまたは組み合わされて培養された骨髄移植により処置されたラットにおいても、機能的結果が改善された。このモデルは、高等な哺乳動物（ヒトを含む）における陽性の結果の、非常に高い予測である。MSCを用いた発作患者の処置のための臨床試験が、再調査のためにInstitutional Review Board of Henry Ford Hospitalに提出される。

#### 【0013】

上記議論は、神経損傷および神経変性の処置のための骨髄移植の使用のための事実に基づく根拠を提供する。本発明を用いて使用される方法および本発明の有用性は、以下の非限定的な例および添付の図により示され得る。

【0014】

当該分野で公知の、特に記載されない標準的な分子生物学技術は、一般に、以下のように従い、そして本明細書中で参考として援用される：Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York (1989)、およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Baltimore、Maryland (1989) およびPerbal、A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley & Sons、New York (1988)、およびWatsonら、Recombinant DNA、Scientific American Books、New YorkおよびBirrenら(編) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series、第1～4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York (1998) および米国特許第4, 666, 828号、同第4, 683, 202号、同第4, 801, 531号、同第5, 192, 659号、および同第5, 272, 057号において示されるような方法論。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications、Academic Press、San Diego、CA (1990) のように一般的に実行された。フローサイトメトリーと組み合わせて、インサイチュ(インセル(In cell))PCRが、特定のDNA配列およびmRNA配列を含む細胞の検出のために使用され得る(Testoniら、1996、Blood 87: 3822)。

【0015】

当該分野で公知で、そして詳細に記載されていない免疫学の標準的な方法は、

以下のように一般的に従った：Stitesら（編）、Basic and Clinical Immunology（第8版）、Appleton & Lange、Norwalk, CT (1994) および Mishell および Shillingi (編)、Selected Methods in Cellular Immunology、W. H. Freeman and Co., New York (1980)。

#### 【0016】

(実施例)

(MSCの脳内移植による発作の処置(ラット))

ラットにおける大脳虚血後の骨髄由来のMSCの脳内移植の説明：この研究に、成体雄性Wistarラットを使用した( $n=28$ )。ラットを管内閉塞モデルを使用して、2時間、中大脳動脈閉塞に供した。実験グループは以下を含む：(コントロール) MSCを移植しないMCAo単独( $n=8$ )；(グループ2)リン酸緩衝化生理食塩水のMCAoの24時間後、虚血境界領域(IZ)への注射( $n=4$ )；(グループ3) 非NGF培養骨髄MSCのMCAoの24時間後、虚血境界領域(IZ)への注射( $n=8$ )；(グループ4) NGF培養MSCのMCAoの24時間後、虚血境界領域(IZ)への注射( $n=8$ )。 $10\mu l$ の総液体容量中約 $4 \times 10^4$ 個の細胞を移植した。ラットは移植片を受け、そしてMCAoの14日後に屠殺された。

#### 【0017】

行動結果測定：機能試験のバッテリー(ロータロッド試験、粘着-除去(adhesive-removal)試験および神経学的重篤度スコア試験)による行動データにより、運動機能および体性感覚機能は、虚血発作により損なわることが示された。グループ間の、ロータロッド試験、粘着-除去試験および NSS 試験の有意な差違は、手術前および移植前には検出されなかった。MCAoのみの動物と比較して、MSCを移植した動物では、体性感覚行動( $p < 0.05$ )および NSS ( $p < 0.05$ )の有意な回復が検出された(図1a, c)。NGFの移植後2週間で、NGFと共に培養したMSCを受けた動物は、MSCのみの移植と比較して、運動( $p < 0.05$ )、体性感覚試験( $p < 0.05$ )お

およびN S S ( $p < 0.05$ ) の行動試験の有意な回復を示した。図1 a、b、cは、それぞれ、粘着一除去試験、ロータロッド運動試験、および神経学的重篤度スコア (N S S) のデータを示す。これらのデータは、運動試験データに示されるように、M S Cの脳内移植による発作の処置が、有意な治療的利点を提供し、そしてM S Cが、N G F中で培養された場合、N G Fなしで培養されたM S Cより優れた治療的利点を提供することを、明らかに示す (図1 b)。

【0018】

(M S Cの脳内移植による発作の処置 (マウス))

発作後のマウスへのM S Cの脳内移植：塞栓性M C A oおよび移植。

【0019】

実験用成体マウス (C 5 7 B L / 6 J、体重2 7 ~ 3 5 g) を、M C A oに供し、そしてM S Cを移植した (n = 5)。コントロールマウスを、M C A oのみ (n = 8)；虚血性線条へのP B Sの注射 (n = 5)；および正常な線条へのM S Cの移植 (n = 5) に供した。M C A oは、本発明者らの研究室で開発した塞栓性モデルを使用して誘導した (Z h a n g ら、1 9 9 7)。簡潔には、フェースマスクを使用して、マウスを3.5%ハロタンを用いて麻酔し、そして70% N<sub>2</sub>Oおよび30%O<sub>2</sub>中1.0%ハロタンを用いて、麻酔を維持した。単一のインタクトなフィブリソリッヂな24時間齢の同種クロット (8 mm × 0.000 6 2 5 mm<sup>2</sup>、0.18 μl) を、改変型P E - 5 0カテーテルにより、M C A の起点に配置した。外科的および生理学的なモニタリング手順は、以前に公開された手順 (Z h a n g ら、1 9 9 7)と同じであった。M C A oの4日後 (n = 1 8)、マウスを定位フレーム (S t o e l t i n g C o. W o o d D a l e, I L) にのせた。無菌技術を使用して、バーホール (1 mm) を頭蓋の右側に作製して、右の皮質を覆っている硬膜を露出した。半懸濁したM S C (3 μl P M S 中 1 × 1 0<sup>5</sup>) を、右線条 (ブレグマから、A P = 0 mm、M L = 2.0 mm、およびD V = 3.5 mm) に、10分間かけてゆっくりと注射した。この位置は、線条内の虚血性境界領域に近い。ドナーの逆流を避けるために、針を線条内にさらに5分間保持した。マウスを、発作後28日に屠殺した。

【0020】

行動試験：各マウスを、一連の行動試験（ロータロッド運動試験、神経学的重篤度スコア）に供して、実験グルーに対して目的的な研究者により、神経学的機能の様々な局面を評価した。測定は、発作の前および発作後28日で行った。

【0021】

結果：BrdU反応性MSCは生存し、そして移植領域から虚血性領域までの約2.2mmの距離を移動した。BrdU反応性細胞は、ニューロンタンパク質（約1% NeuN）および星状細胞タンパク質（約8% GFAP）を発現した。ロータロッド試験（ $p < 0.05$ ）および改変された神経学的重篤度スコア試験（運動、感覚および反射を含むNSS、 $p < 0.05$ ）からの機能回復は、MSCを受けたマウスでは、MCAoのみと比較して、有意に改善された（図2）。図2は、MSCを移植して処置されたマウスが、ビヒクルで処置した動物と比較して、ロータロッドにおける持続時間の有意な改善を示し（図2）、そして改変された神経学的機能を示す（図2）ことを表す。この所見は、脳内移植したMSCが虚血性の脳において生存し、そして成体マウスの機能回復を改善することを示唆する。

【0022】

（MSCの脈管内投与による発作の処置（マウス））

実験の説明：

体重270～290gの成体雄性Wistarラット（n=30）を用いて実験を行った。全ての外科的手順において、ラットにおける麻酔は、3.5%ハロタンで誘導し、そしてフェースマスクを使用して、70%N<sub>2</sub>Oおよび30%O<sub>2</sub>中1.0%ハロタンで維持した。直腸温は、フィードバック調節型温水システムを使用して37°Cに制御した。一過性MCAoは、上記のように、管内血管閉塞の方法を使用して誘導した。MCAoの2時間後、その先端部が内頸動脈から取り除かれるまで、縫合を引き抜くことによって、再灌流を行った。

【0023】

（a-MSCの頸動脈内投与）MSCの頸動脈内移植を、MCAoの24時間後に行った（n=23）。改変型PE-50カテーテルを、MCAの起点に対して2mm近位に静止するまで、外頸動脈の同じ部位から内頸動脈の管腔に進めた

(図1)。 $200\mu l$  PBS中約 $2 \times 10^6$ のMSC ( $n=6$ ) またはコントロール液 ( $200\mu l$  PMS,  $n=8$ ) を10分間かけて各実験用ラットに注射した。いずれの動物にも免疫抑制薬は使用しなかった。全てのラットを、MCAoの14日後に屠殺した。

【0024】

(b-MSCの静脈内投与) MSCの静脈内投与のため、大腿静脈にカニューレ挿入し、そして $1.5 \times 10^6$ MSCまたは $3 \times 10^6$ MSCを注射した。

【0025】

行動試験および免疫組織化学：各ラットを、一連の行動試験 ( NSS および粘着除去試験) に供して、MCAo前、ならびにMCAoの1、4、7、および14日後の神経学的機能を評価した。単一および二重の免疫組織学的を用いて、BrdU反応性MSCの細胞特異性タンパク質を同定した。

【0026】

結果：動脈内投与について、BrdU反応性細胞 ( $2 \times 10^6$ 個の移植MSCの約21%) は、虚血の14日後まで、MCAの領域全体に分散した。いくらかのBrdU反応性細胞は、星状細胞 (グリア原線維性酸性タンパク質 (GFAP)) およびニューロン (微小管結合タンパク質-2、MAP-2) に特徴的なタンパク質を発現した。MSCを動脈内移植したラットは、コントロールと比較して、14日目に粘着-除去試験 ( $p < 0.05$ ) (図3)、および改変された神経学的重篤度スコア ( $p < 0.05$ ) (図3) における有意な改善を示した。MSCの静脈内投与についてのデータは、非常に類似していた。すなわち、MSCで処置したラットは、プラシーボ処置したラットと比較して、有意な機能的改善があった。図4は、コントロールの虚血ラットと比較した、MSCを静脈内投与したラットの機能データを示す。有意な改善は、コントロール動物と比較して、発作の7日後および14日後に、ラットがそれらの足から粘着性のタブ (tab) を除去するスピードで示される (図4)。MSCの動脈内投与で処置されたラットの全神経学的機能は、発作の14日後に、コントロール虚血ラットと比較して有意に改善した。この所見は、動脈内注射されたMSCが局在化し、そしてMCAの領域に向かい、それらの細胞が大脳虚血後に、機能の改善を促進す

ることを示唆する。さらに、MSCの静脈内投与もまた、機能的結果の有意な改善を提供する。従って、本発明者らは、静脈投与が、治療的に有利なMSCの投与の実行可能かつ有効な経路であることを示した。

#### 【0027】

(MSCの脳内移植による外傷性脳損傷の処置(ラット))

説明：体重250～350gの66匹の雄性Wistarラットを使用して、実験を行った。制御皮質衝突デバイスを使用して、損傷を引き起こした(Dixon Eら、A Controlled cortical impact model of traumatic brain injury in rat, J. Neuroscience Methods 39: 253～262, 1991)。4mm/sの速度で移動し、2.5mmの圧縮を生成する、6mmの直径を有する空気式ピストンを、左皮質に衝突させることにより、損傷を引き起こした。BradU標識したMSCをドナー動物から収集し、そして発作実験と同様に、同側の大脳半球に移植した。MSCを、損傷の24時間後に、脳に移植した。MSCを受けたラットを、移植の、4日後(n=4)、1週間後(n=15)、2週間後(n=4)および4週間後(n=4)に屠殺した。コントロール動物を以下の3つのグループに分けた：1) 損傷に供し、移植を行わず、そして損傷の8日後(n=4)および29日後(n=4)に屠殺したラット；2) 損傷の1日後にPBSを注射し、そしてPBS注射の4日後(n=4)、7日後(n=4)、14日後(n=4)、および28日後に屠殺したラット；3) 開頭しているが、損傷も移植もしていない、開頭の8日後(n=4)、および29日後(n=4)に屠殺した偽コントロールラット。

#### 【0028】

結果測定(行動、組織学)：加速的ロータロッド試験を用いて、運動機能を測定した。測定は、損傷の2、5、15、および29日後に実施した。屠殺後、脳切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、そして二重標識免疫組織化学を行って、MSC細胞型を同定した。

#### 【0029】

結果：組織学的試験は、移植後に、MSCが生存し、増殖し、そして損傷部位

に移動することを示した。BrdU標識したMSCは、星状細胞およびニューロンのマーカーを発現した。MSCを移植したラットは、コントロール動物と比較して、運動機能の有意な改善を示した。本発明者らのデータは、MSCの脳内移植が、外傷性脳損傷後、神経機能を有意に改善することを示す。相完的セットの試験において、本発明者らはまた、外傷性脳損傷に供したラットをMSCで処置した；しかし、この試験において、MSCは、動脈内（頸動脈内）投与により脳に送達されなかった。データは、頭蓋内移植に類似した。MSCは、脳の損傷領域に容易に移動し、そしてこれらの細胞は、脳細胞（星状細胞、ニューロン）のタンパク質マーカーを発現した。従って、本発明者らの研究は、外傷性脳損傷が、MSCの脳内投与または血管経路を有する投与により処置され得ることを示す。

#### 【0030】

(MSCの頭蓋内移植によるパーキンソンの処置（マウス）)

(MPTP法の説明および結果)

成体雄性C57BL/6マウス（8～12週齢、体重20～35g）を、この実験に使用した。重篤な長く続く病変を得るために、マウスを、7日間続けて一日一回、生理食塩水中のMPTP塩酸塩（30mg/kg、Sigma）の腹腔内注射で処置した（全用量210mg/kg）。マウスの右線条に、定位置にBrdU標識したMSC（ $3 \times 10^5 / 3\mu l$ ）を直接移植した。

#### 【0031】

（行動試験）

各MPTP注射を受けたマウスは、文献[Hekkilaら、1. 1989]で報告されたように、行動異常性（運動不能、体位不安定性、震えおよび硬直）を数時間示し続けた。

#### 【0032】

ロータロッド試験を使用する薬物を使用しないパーキンソン病の評価は、Rozasら[1997、1998]により記載される。MSC移植した、またはMSC移植していないMPTP-PDマウスを、さらに増強した薬物注射を行うことなく、最後のMPTP注射（安定な値を得るために、一日につき5回試行）の

後、増加速度（16 rev／分および20 rev／分）にて、ロータロッドを用いて試験した。マウスがロータロッドから落ちた場合、試行を終了した。M S C移植により処置したパーキンソン病のマウスにおいて、コントロールのM P T P注射のみしたマウスと比較して、M P T P注射の35日後に、運動機能の有意な改善（ $p < 0.05$ ）が観察された。図5は、M P T P神経毒性に供したマウスのロータロッド結果を示す。以下の2つの実験を行った：マウスを16 rpmまたは20 rpmで回転するロータロッドに配置した。このデータは、M S Cで処置したマウスが、P B Sを脳内投与されたM P T Pマウスと比較して、両方の角速度のロータロッドにおける持続時間の有意な増加を示したことを示す。N G Fと共に培養したM S Cで処置したマウスは、M S C処置と比較して、その差違は有意ではないものの、増加した利点を有するようである。

#### 【0033】

##### （形態学的変化）

生存B r d U免疫反応性細胞を、注射領域において同定し、そして35日目に、宿主線条までの可変距離まで移動させた（図1 b）。二重染色は、散在したB r d U反応性細胞（図1 c）が、移植片内で、チロシンヒドロキシル（ドーパミンマーカー）免疫反応性を発現することを示す（図1 d）。

#### 【0034】

結果：これらのデータは、M S Cの脳内移植が、マウスにおけるパーキンソン病の症状を軽減することを示す。

#### 【0035】

##### （M S Cの病変内移植による脊髄損傷の処置（ラット））

##### （脊髄損傷の説明）

脊髄損傷：重りの落下（25 mmの高さから10 g、「N Y U衝突」モデル）を使用して衝突損傷を引き起こし、中程度の重篤度の脊髄損傷を生じさせた。成体雄性W i s t a r ラット（ $300 \pm 5$  g）をペントバルビタール（50 mg/kg、腹腔内）で麻酔し、そして椎弓切除をT 9 レベルで行った。

#### 【0036】

移植および行動試験：M S C  $2.5 \times 10^5 / 4 \mu l$  を、S P Iの7日後に、

損傷の中心に注射した。Basso-Beattie-Bresnahan (BB) Locomotor Ratingスコアを、移植の前後に得た [Bassoら、1995]。図7は、脊髄損傷を受け、MSC移植で処置された動物、または単に同用量のビヒクルを投与された動物のBBB試験のデータを示す。全てのラットは、脊髄損傷前に、21のスコア（正常なスコア）を有し、そして挫傷後に0～6のスコアを有した。PBS注射を受けた挫傷に供したラットにおいて、スコアは、6.7（1週間）から11.5（5週間）に改善した。コントロールグループは、初期は神経学的機能の改善を有し、これは三週間目まで横ばい状態に達した。MSC移植を受けた挫傷に供したラットは、7.0（1週間）および15.3（5週間）の有意に改善されたスコアを有した。MSCで処置されたグループは、この実験の終点である5週間目まで横ばい状態に達しない安定した回復を示した。MSCで処置したラットは、処置効果について、別個の時点の全ておよび各々について、p値0.01を有するBBBスコアにおける有意な改善を有した。機能的期間において、MSC処置したグループにおける挫傷したラットは、前脚および後ろ脚が協調した、一貫した重量が支持された足底の歩調で歩行し得た。逆に、PBSコントロールグループにおける挫傷したラットは、明らかな運動機能欠陥を示した。

#### 【0037】

##### (組織学的分析)

MSCから誘導された細胞 (BrdU免疫反応性によって同定される) は、MSC移植後1週間～4週間、生存し、そしてこの損傷組織 (T9、図1a) にわたって分散された。BrdU反応性の細胞は、移植した細胞の中心から尾部および頭部の両方に5mm移動した (図1b)。図2aは、Ripに対する抗体が、PBS注射による未処置の挫傷ラットにおいて、損傷稀突起神経膠細胞と反応しなかったことを示す。対照的に、脊髄損傷およびMSC移植後で (図2b)、強いRip免疫反応性が、小さい直径および大きい直径の有髓線維を明確に区別した。二重免疫染色 (図2c～d) は、散乱したBrdU反応性の細胞が、ニューロンマーカー (NeuN) を発現することを実証する。

#### 【0038】

(結論：) 中程度～重篤な脊髄損傷の損傷部位へのMSC移植による処置は、運動機能の有意な改善を提供する。MSCは、ニューロンおよび稀突起神経膠細胞のタンパク質マーカーを発現し、これは、これらの細胞が脊髄内に配置された場合に、実質細胞の特性を獲得することを示す。

【0039】

(ニューロスフェア (neurosphere) (NMCスフェア) - CNSの損傷および疾患の処置のための新規複合体)

(ニューロスフェア実験の説明)

本発明者らは、胎児ニューロスフェア由来の神經幹細胞、成体骨髄由来の間葉幹細胞および成体Wistarラット由来の脳脊髄液からなる凝集体（NMCスフェアと呼ばれる）を使用した。胎児脳細胞を、1, 1' -ジオクタデシル (dioctadecy) -6, 6' -ジ (4-スルホフェニル) -3, 3, 3' , 3' -テトラメチルインドカルボシアニン (DiI) で前標識し、そして成体ラット由来の骨髄間葉細胞を、3, 3' -ジオクタデシルオキサカルボシアニンペルクロレート (DiO) および／またはプロモデオキシウリジン (BrdU) で前標識した。パラフィン凍結切片に対するレーザー走査共焦点顕微鏡（3次元）および免疫組織化学的分析を使用して、本発明者らは以下を同定した：

1. (細胞間相互作用) : NMCスフェア下で、骨髄間葉幹細胞から誘導された細胞は、迅速に足場（1日目）および網状構造（9日目、図8）を経時にインピトロで形成する。図8は、細胞-ニューロスフェア統合後9日目の複合体MSCニューロスフェアを示す。このMSC (DiOおよびBrdUによって同定される) は、軸索樹状様の網状構造（黄緑）を形成する。

2. (細胞間相互作用) : NMCスフェア下で、神經幹細胞から誘導された細胞は、ニューロスフェア単独下よりも長い寿命を有した。NMCスフェアは、例えば、以下のタンパク質を発現する：未成熟神經細胞に通常見い出される、ネスチン；分化した星状細胞についての特異的マーカーである、神經膠原線維酸性タンパク質 (GFAP) ; 稀突起神經膠細胞のマーカーである、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) ; および未成熟ニューロンについてのマーカーである、ニューロン特異的クラス I II β-チューブリン (Tuj1) 、ならびにニューロン細

胞体および樹状突起についてのマーカーである微小管結合タンパク質-2 (MAP-2)。

3. (NMCスフェア-微小環境) : NMCスフェアのサイズおよび構造は、培地の微小環境によって影響され、すなわち、これらは、標準的なD MEMよりも、幹細胞因子を含むIMDM中でより良好に増殖する。

4. (NMCスフェアの分泌) : ニューロスフェアおよびMSCのための培地D MEMおよびIMDM内に、培養したNMCスフェアからの上清を添加することは、それぞれ、ニューロスフェアおよびMSCの両方の増殖を刺激した。この上清によって、明らかな細胞間連結および増殖が誘導された。これは、NMCスフェアが、幹細胞についての支持物質を分泌することを示唆する。これらの物質を使用して、神経発生を増強し得る。

5. 脳脊髄液 (CSF) は、従来の培地より優れた、NMCスフェアを形成するための最適な微小環境を提供する。

#### 【0040】

(NMCスフェアでの発作および脳外傷の処置)

(MCAoおよびTBI後のラットにおけるMSCおよびニューロスフェア移植のためのプロトコル)

(MCAo)

BrdU前標識したMSCおよびニューロスフェアを混合し、そして7日間フラスコで培養した。MCAo後24時間で、ラットをハロタンで麻酔し、そして複合体NMSスフェアを、脳に注射した ( $n=4$ )。これらの動物を、定位装置 (Model 51603, Stoeling Co., Wood Dale, IL) 上にマウントした。5mlのPBS中20個のスフェア (0.2mm未満の直径) を、ブレグマに対して座標LM=2.5mm, VD=4.5mmおよびAP=0mmの右線条に、およびLM=2.5mm, VD=2mmおよびAP=0mmの右皮質に、Hamiltonシリジによって垂直に注射した。この位置は、虚血性の境界領域に近接する。3μlのスフェアを、線条に最初に注射し、そして2mlを、各スポットにおいて10分にわたって皮質に注射した。針を、さらに5分間皮質中に保持し、注射領域から脳表面への骨髄の逆流を回避し

た。注射後、骨ろう (W810、Ethicon) を、頭蓋に配置し、溶液の漏出を妨げた。ラットを、MCAo後14日目で屠殺した。

【0041】

(外傷性脳損傷 (TBI))

BrdU前標識したMSCおよびニューロスフェアを混合し、そして7日間プラスコで培養した。TBI後4日目に、ラット ( $n=4$ ) を、含水塩化物 (chloride hydrate) で麻酔し、そして定位枠上に配置し、次いで、先に損傷させた領域を露出させた。20ULのPBS中の15の調製した混合NMCスフェア (0.25mm直径) を含む、ガラスチップ (0.5mm直径) を有するピペットを、この定位枠上に固定した。針の先端を、損傷領域の中心部位に、脳の表面から2.5mm離して挿入した。5分間にわたって脳にスフェアを注射し、次いで、さらに5分間維持して逆流を回避した。両実験セット (発作およびTBI)において、機能的結果の測定を、ロータロッド試験および粘着除去試験を使用して測定した。

【0042】

(結果) : 発作およびTBIの両方における機能的利点は、NMCスフェアで処置したラットにおいて明らかであった。これらのデータは、NMCスフェアが、発作および脳損傷の処置に使用され得ることを示す。この複合体は、CNS損傷および神経変性の処置の潜在能力を有する新規な物質である。

【0043】

(神経損傷および神経変性の処置のためのMSCの培養に使用される新規培地 (増殖因子含有および非含有) の説明)

一次骨髄細胞を、5-フルオロウラシル (5-FU、150mg/kg) での成体Wistarラットの処置後48時間で獲得し、そして10%胎仔ウシ血清 (FBS) および幹細胞因子 (100ng/ml) を補充したイソコブ (Isocove) 改変ダルベッコ培地 (IMDM) 中で培養した。粘着性MSCを、神経成長因子 (NGF、200ng/ml) 、脳由来神経栄養因子 (BDNF、100ng/ml) および上皮増殖因子 (EGF、20ng/ml) を含む新鮮なIMDM中に1ヶ月間再懸濁した。コントロールMSCを、神経成長因子を含ま

ないIMDM中で培養した。ニューロン核(NeuN)、微小管結合タンパク質-2(MAP-2)および神経膠原線維酸性タンパク質(GFAP)に対する抗体を、培養細胞の免疫細胞化学的同定に使用した。

#### 【0044】

このデータは、成体骨髓幹細胞および前駆細胞由来の細胞が、培養物中で多量に増殖し得、ニューロンおよび星状細胞に特徴的なタンパク質を発現し得ることを示す。神経栄養増殖因子は、インビトロで、骨髓細胞由来の細胞の神経発現を増強する。免疫細胞化学的染色は、神経栄養増殖因子を含まないコントロールMSCが、ニューロンNeuN(約1%、図1a)および星状細胞GFAP(約3%、図1b)を発現することを示す。しかし、神経栄養増殖因子(例えば、NGF)で処理したMSCは、ニューロンNeuN(約3%、図1c)および星状細胞GFAP(約30%、図1d)を発現する。

#### 【0045】

プロモデオキシウリジン(BrdU、3Fg/ml)(これは、分裂細胞に取り込まれ、そして新しく形成されたDNAを同定する)を、移植72時間前に培地に添加した。3'3-ジアミノベンジン(DAB、褐色)と共に免疫ペルオキシダーゼを使用し、そしてヘマトキシリソによって対比染色して、骨髓細胞をBrdUに対する抗体によって同定する。BrdUで標識されたMSCの数は、インビトロで約90%である。

#### 【0046】

##### (考察)

このデータは、培養成体骨髓細胞(特に、骨髓幹細胞(MSC))が、虚血、脳外傷および脊髄外傷、ならびにパーキンソン病後の成体齧歯類脳において生存し、そして実質様細胞に分化すること、および骨髓が、VZ/SVA NSCの顕著な増殖、分化および移動を促進することを実証する。

#### 【0047】

多能性骨髓細胞は、正常ラット脳においてグリアになり(Aziziz, 1998)、そしてMCAo後の細胞増殖および細胞特異的分化を促進する。骨髓移植実験は、骨髓細胞の運命をモニタリングする高感度の手段を必要とする。トレ

ーサーおよびマーカー（例えば、BrdU、CD34、ネスチン、PCNA）を保有する骨髓細胞により補助される。MCAo後の新しい虚血性の微小環境に曝露された成体骨髓由来の多能性造血幹細胞および間葉幹細胞は、増殖そしてニューロン細胞（MAP-2、NeuN）表現型およびグリア細胞（GFAP）表現型に分化するように誘発される。新鮮な骨髓または支質体液因子（stromal humoral factor）はまた、分化因子の供給源であり、そしてVZ/SVZから神経幹細胞の増殖、移動および分化を増強するための走化性微小環境を提供する。

#### 【0048】

哺乳動物前脳のVZ/SVZは、妊娠後期に発生し、拡大し、次いでサイズが減少するが、生涯、痕跡形態で存続する、胚性マトリクスの領域である（Gage 1998）。正常成体脳において、前脳ニューロン産生の非存在は、適切な神経幹細胞の消失を反映するのではなく、むしろ分裂後期の栄養支持および遊走（移動）支持の持続性の阻害および／または消失を反映する。正常VZ/SVZ内の休止CNS幹細胞を細胞周期に進入するよう誘発するシグナルは、まだ解明されていないが、これらのデータは、病変性CNSが、インタクトなCNSとは異なる環境であり、そして神経幹細胞の最終分化された表現型を顕著に変更することを示す。重要なことに、成体前脳中のVZ/SVZが、受動性の虚血切迫性のゾーンではなく、虚血領域から離れて位置し（図3F～H）、脳を再構築するための細胞を提供する活性組織である。VZ/SVZ細胞は、MCAo後にニューロン表現型およびグリア表現型に増殖および分化する。成体NSCから生じるニューロンの生存は、遊走の許容性経路の利用能および遊走が生じる環境の両方によって決定される。新しいニューロンは、VZ/SVZから離れて、放射状の誘導線維（radial guide fiber）を介して脳実質に進入する。これらの線維は、成体ラットの脳室上衣中の細胞体から出発し（図2K～L）、そして発生中に見い出されるような遊走の許容性経路を提供する（Rakic 1972）。移植片およびVZ/SVZ内の有糸分裂は、移植された細胞と共に虚血性の損傷された脳が、発生初期に戻って修復を促進することを示す。これらのデータは、成体脳が、新しいニューロンを形成し得るという観察（Gage

1998)と一致する。

【0049】

要約すると、これらのデータは、発作性の神経損傷およびパーキンソン病後の脳内および脈管内の骨髓移植が、機能的回復を有意に改善することを示す。移植はまた、外因性骨髓幹細胞および内因性NSCの増殖および分化を増強する。骨髓吸引および生検は、臨床疾患の診断および処置に使用されている。骨髓移植は、損傷した脳および脊髄の可塑性を誘導するための新しい手段を提供し、そして神経損傷および神経変性の処置のための治療ストラテジーを提供する。

【0050】

さらに、新規物質である、MSCおよびニューロスフェアの複合体を同定し、これは、発作または外傷後の脳に移植した場合に、機能的回復を改善する。

【0051】

本出願を通して、種々の刊行物が、著者および年によって参照される。これらの刊行物の全ての引用を、以下に列挙する。これらの刊行物のそれら全体の開示は、本発明が属する技術状態をより十分に記載するために、本出願に参考として本明細書中に援用される。

【0052】

本発明は例示的様式で記載され、そして使用される技術用語は、限定ではなく記載のための用語であることが意図されることが理解される。

【0053】

明らかに、本発明の多くの改変および変更が、上記の教示を考慮して可能である。従って、添付の特許請求の範囲内で、本発明が、具体的に記載される以外で実施され得ることが理解される。

【0054】

(参考文献)

【0055】

【表1】

Burke and Olson, "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors" in Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 17, pp. 251-270 (1991).

Capecchi, "Altering the genome by homologous recombination" Science 244:1288-1292 (1989).

Davies et al., "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer", Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 11, pp. 2693-2698 (1992).

Dickinson et al., "High frequency gene targeting using insertional vectors", Human Molecular Genetics, Vol. 2, No. 8, pp. 1299-1302 (1993).

Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995.

Huxley et al., "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", Genomics, 9:742-750 (1991).

Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", Nature, Vol. 362, pp. 255-261 (1993).

Lamb et al., "Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice", Nature Genetics, Vol. 5, pp. 22-29 (1993).

Pearson and Choi, *Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. 90:10578-82.

Rothstein, "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" in Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 19, pp. 281-301 (1991).

(参考文献)

Schedl et al., "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", Nature, Vol. 362, pp. 258-261 (1993).

Strauss et al., "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine  $\alpha_1$  (I) collagen locus", Science, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).

Gilboa, E, Eglitis, MA, Kantoff, PW, Anderson, WF: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. BioTechniques 4(6):504-512, 1986.

Clegg JM, Vedvick TS, Raschke WC: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, Bio/Technology 11:905-910, 1993

Culver, 1998. Site-Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February, 1998, Coronado, CA.

Huston et al, 1991 "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" in Methods in Enzymology (JJ Langone, ed.; Academic Press, New York, NY) 203:46-88.

Johnson and Bird, 1991 "Construction of single-chain Fvb derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*" in Methods in Enzymology (JJ Langone, ed.; Academic Press, New York, NY) 203:88-99.

Mernaugh and Mernaugh, 1995 "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" in Molecular Methods In Plant Pathology (RP Singh and US Singh, eds.; CRC Press Inc., Boca Raton, FL) pp. 359-365.

添付の図面と関連して考えられる場合、同じことが以下の詳細な説明に対する参考によりより良く理解されことから、本発明の他の利点が容易に理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 A～Bは、骨髄移植による、MCA<sup>o</sup>の2時間後のラット脳の3領域の図である。

【図2】

図2 A～Lは、代表的タンパク質の免疫反応性におけるH&E調製切片の骨髄

細胞を示し、骨髄移植4日後に殺傷されたラット由来の、一連の隣接する切片のIBZにおける写真である(A-H)。図2Iは、神経特異的核タンパク質(NeuN)を示し；図2Jは、上衣細胞に隣接した細胞の骨髄細胞移植が、ニューロンマーカーMAP-2に対して反応性を示すことを示し；そしてK-Lは、SVZの細胞が、NeuroDおよびGFAPタンパク質マーカーを発現することを示す。

【図3】

図3A-Hは、MCAが骨髄細胞移植により移植された後、大脳組織のH&E調製切片を示す写真である。図3I-Jは、4日目の骨髄移植片内におけるアポトーシス様細胞を示した、TUNEL染色を示す写真である。

【図4】

図4A-Cは、それぞれ、粘着除去試験、ロータロッド運動試験および神経学的重篤度のスコアからのデータである。

【図5】

図5A-Bは、MSC移植により処置されたマウスが、ロータロッドにおける持続期間において有意な改善を示したことを示す移植片、およびビヒクルで処置された動物と比較してどれほど神経学的機能を改善したかを示す。

【図6】

図6A-Bは、ラットが、MSC動脈内移植により、粘着除去試験において有意な改善を示したこと、およびコントロールと比較して14日の改変された神経学的重篤度スコアを示す。

【図7】

図7A-Bは、コントロール虚血性ラットと比較した、脈管内にMSCを投与されたラットの機能性データを示す。

【図8】

図8は、MPTP神経毒性に供されたマウスのロータロッドデータを示す。

【図9】

図9A-Dは、形態学的变化を示す。すなわち、MPTP-DPマウスにおいて、MSC移植後45日で、ほとんどの縮んで着色されたニューロンが消失し、

# Available Copy

およびそれらのほんの少しだけが黒質において観察された；生存可能なBrdU免疫反応性細胞が、注射領域において同定され、そして45日で宿主線条の中へ不定の距離で移動した；二重染色が、散在したBrdU反応性細胞が移植片内でTH免疫反応性を発現することを示す。

## 【図10】

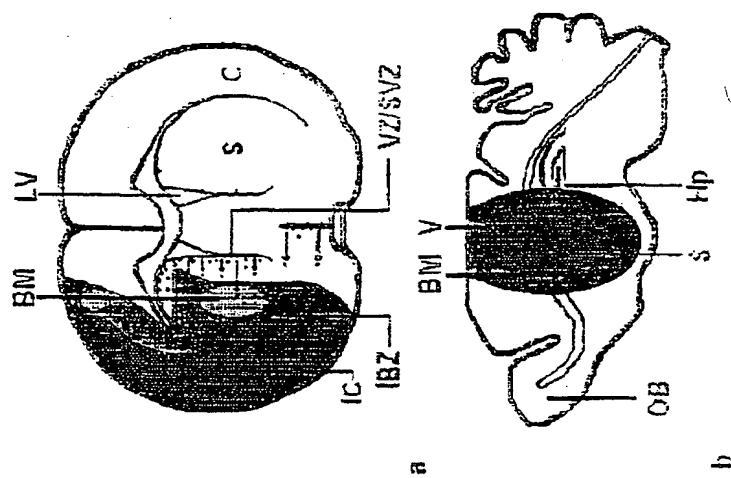
図10は、脊髄損傷に供された動物のBBB試験からのデータを示す。

## 【図11】

図11は、細胞ニューロスフェア形成9日後の複合体MSCニューロスフェアを示す写真である。

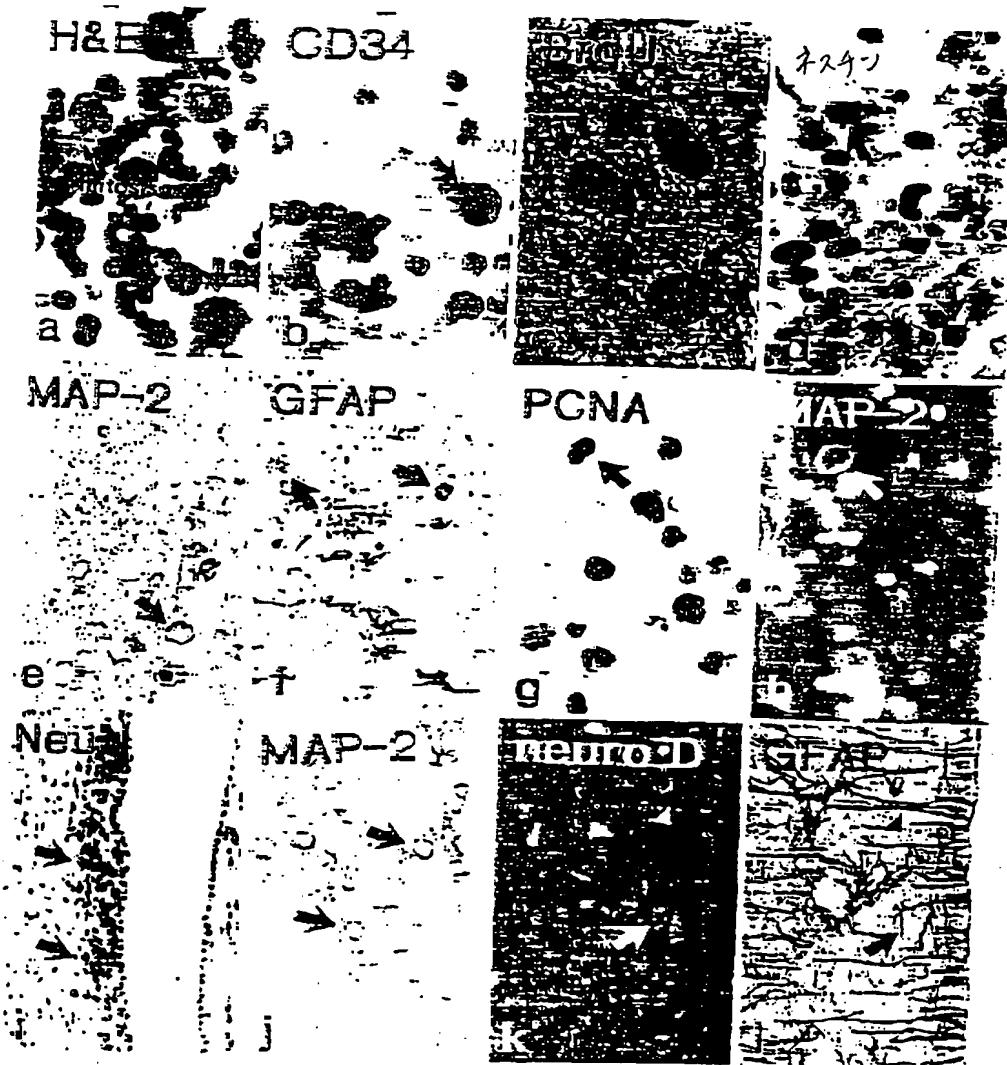
## 【図1】

Figure 1



# Best Available Copy

【図2】



# Best Available Copy

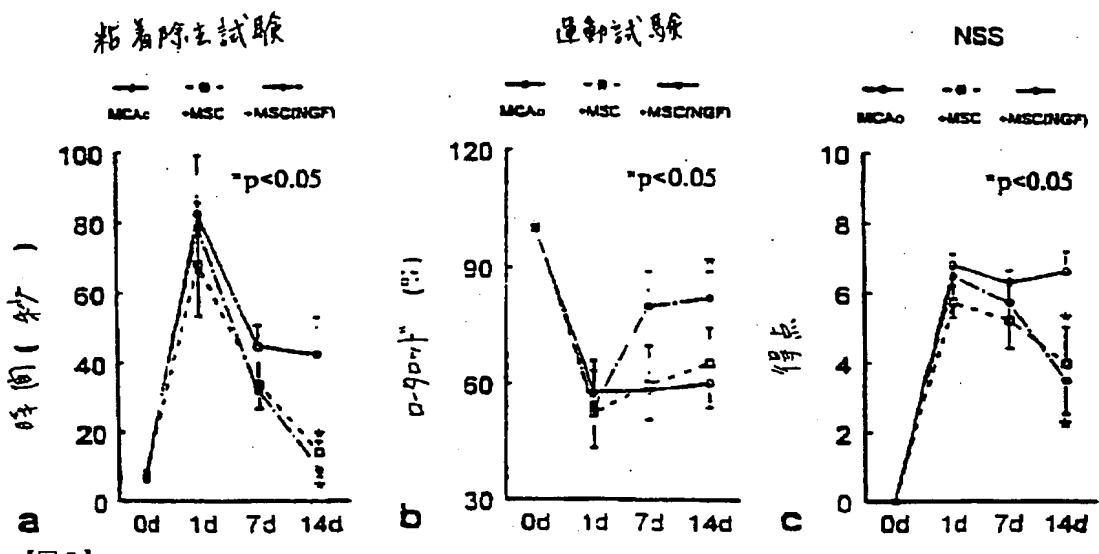
【FIG 3A-J】



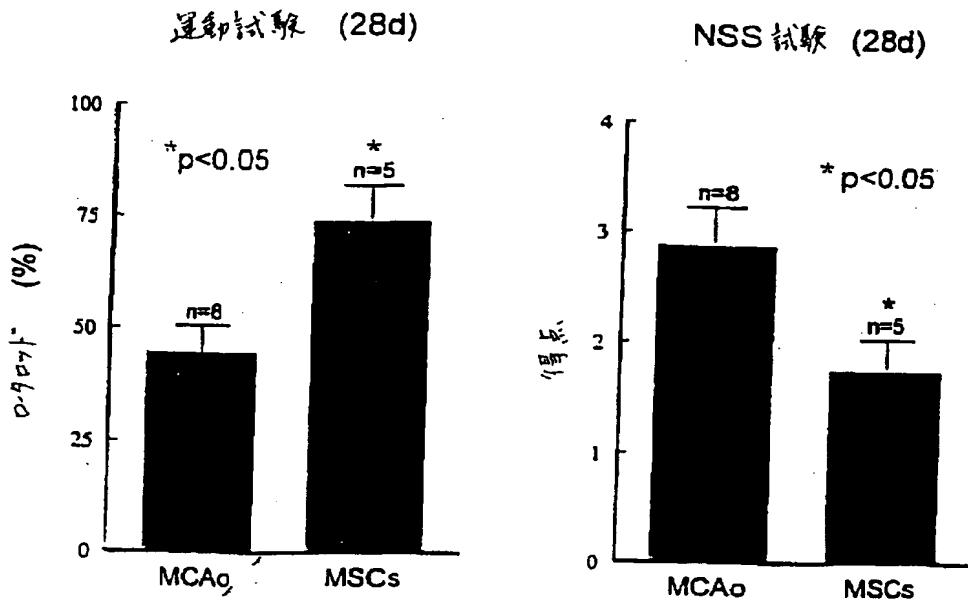
FIGS. 3A-J

# Best Available Copy

【図4】

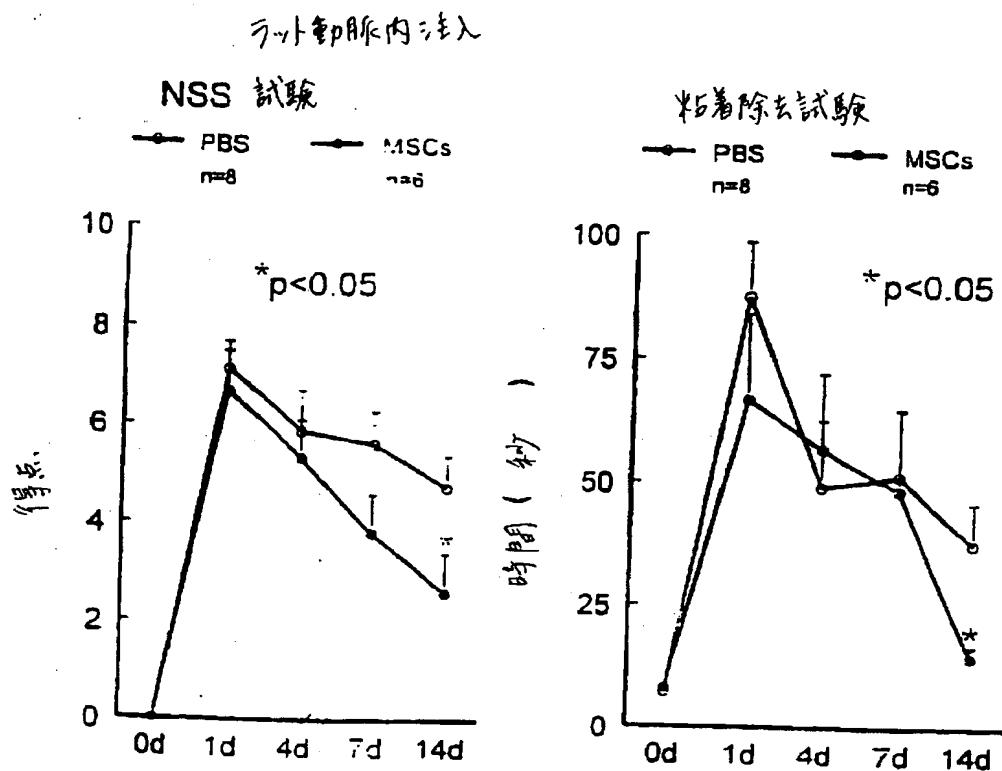


【図5】

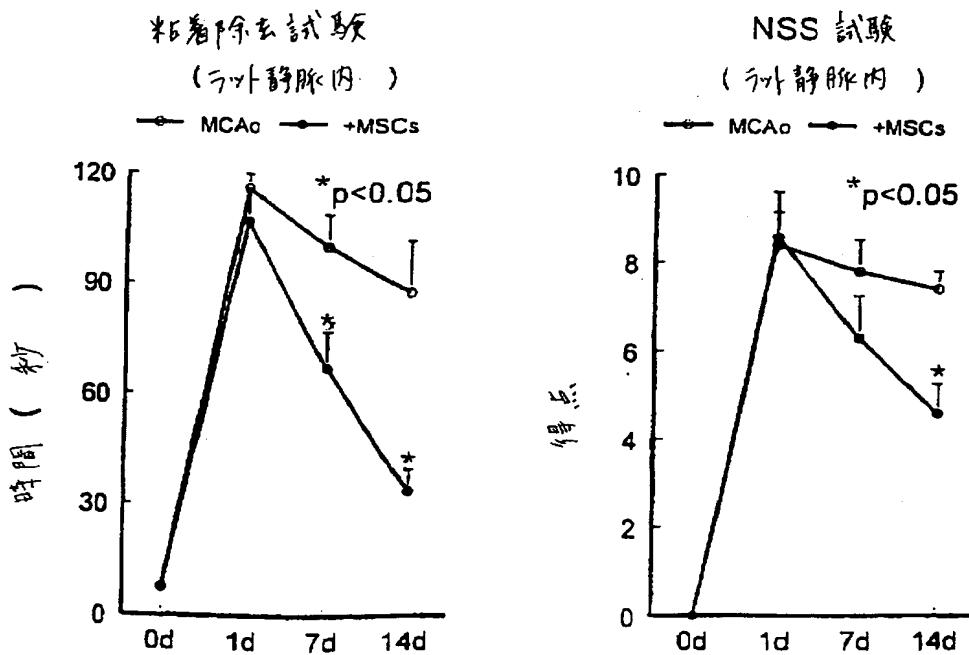


# Best Available Copy

【図6】

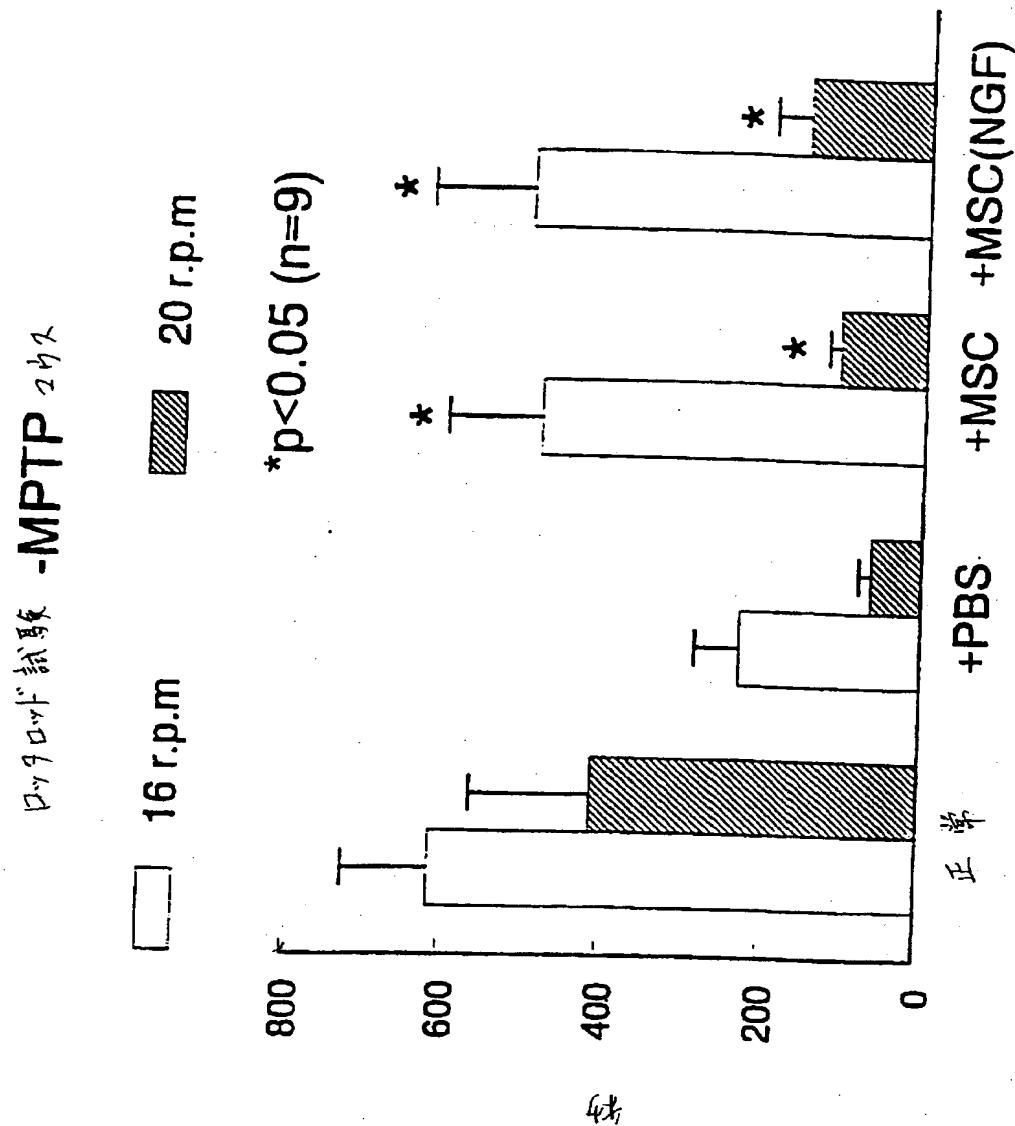


【図7】



# Best Available Copy

【図8】



# Best Available Copy

【図9A-D】

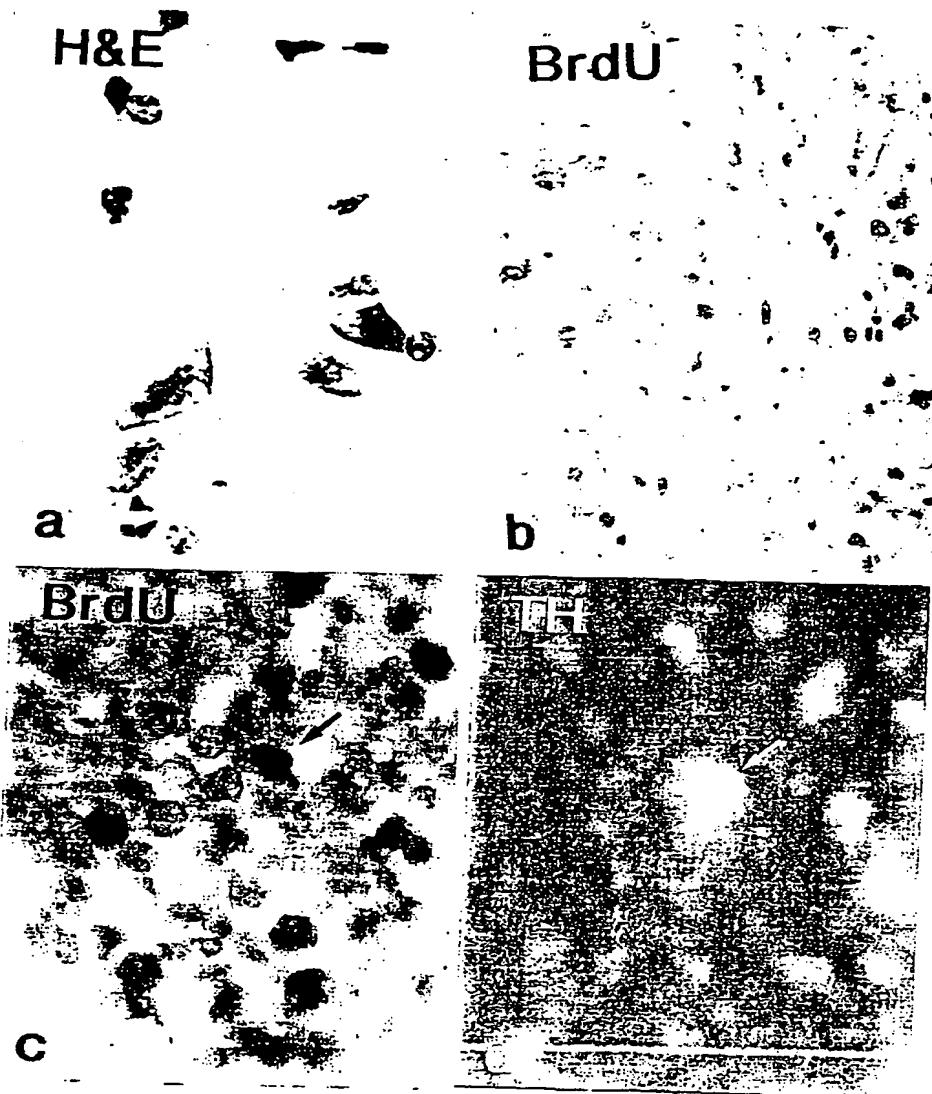
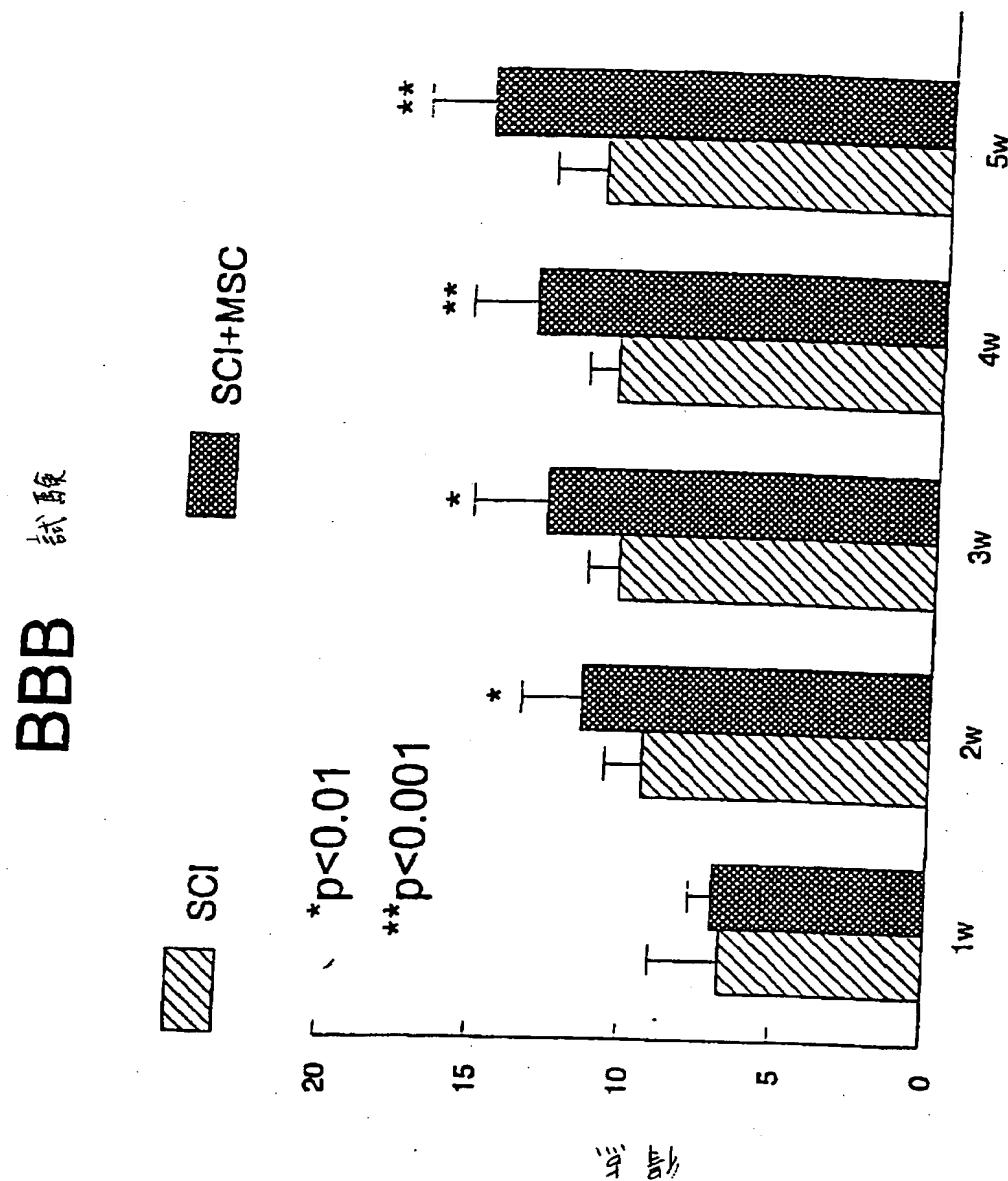


FIG. 9 A-D

# Best Available Copy

【図10】



# Best Available Copy

【図11】

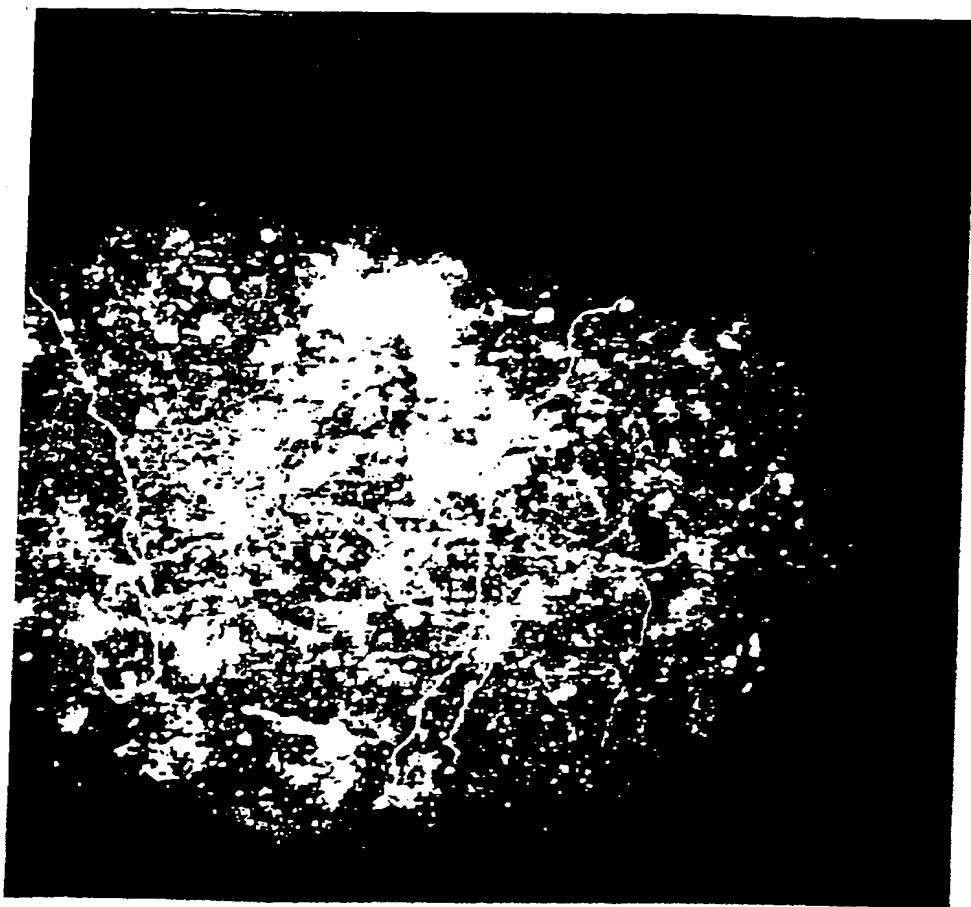
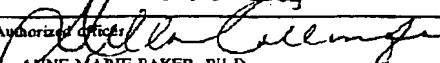


FIG. 11

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/12875
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 35/00 US CL. : 424/93.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,750,376 (WEISS et al.) 12 May 1998, entire document.	1-4
A	US 5,690,927 (MAJOR et al.) 25 November 1997, entire document.	1-4
A	JACKOWSKI et al. Neural injury repair: hope for the future as barriers to effective CNS regeneration become clearer. British J. Neurosurgery. 1995. Vol. 9, pages 303-317, entire document.	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 JULY 2000	Date of mailing of the international search report <i>19 SEP 2000</i>	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  ANNE-MARIE BAKER, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)\*

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US00/12875

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST

Dialog (file: medicine)

search terms: transplan?, bone(w)marrow, cell?, brain, spin?, neuron, neurosphere, mesenchymal(w)stem(w)cell,  
neural, neurodegenerative, stroke, injury

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)\*

---

フロントページの続き

(81) 指定国      EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ  
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K  
E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
, EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C  
R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI  
, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K  
Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA  
, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, S  
K, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG  
, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB44 BB64 MA66

NA14 ZA02 ZA15